

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

30. Juni 1998

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 11 AUG 1998

WIPO PCT

**Bescheinigung**

Die ASAT AG Applied Science & Technology in Zug/Schweiz hat  
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Rekombinante Antikörper"

am 12. Dezember 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht und  
erklärt, daß sie dafür die Innere Priorität der Anmeldung in  
der Bundesrepublik Deutschland vom 6. Juni 1997, Aktenzeichen  
197 23 904.8, in Anspruch nimmt.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole  
C 12 N, C 07 H und C 07 K der Internationalen Patentklassi-  
fikation erhalten.

München, den 15. Juni 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Münch

Anzeichen: 197 55 227.7

**PATENTANWÄLTE**

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN**  
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**  
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**  
DR.-ING. **H. LISKA**  
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**  
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**  
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**  
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**  
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**

**POSTFACH 860 820**  
**81635 MÜNCHEN**  
•  
**KOPERNIKUSSTRASSE 9**  
**81679 MÜNCHEN**  
•  
**TELEFON (089) 4 55 63-0**  
**TELEX 5 22 621**  
**TELEFAX (089) 4 70 50 68**  
eMail weickmann@compuserve.com

**12. Dez. 1997**

Unser Zeichen:  
**16824P DE-1/WWvo**

*eingereicht*

Anmelder:  
**ASAT AG**  
**Applied Science & Technology**  
**Baarerstrasse 77**

**6302 Zug**  
**Schweiz**

---

**Rekombinante Antikörper**

---

## R kombinante Antikörper

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane Autoantikörper gegen Blutplättchen-Membranproteine und für antiidiotype Antikörper kodieren, neue Aminosäuresequenzen von humanen Antikörpern und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von  
10 Krankheiten.

Autoimmun-thrombozytopenische Purpura (AITP) ist eine Immunkrankheit, die durch eine geringe Blutplättchenzahl bei normaler oder gesteigerter Megakaryozytopoiese definiert ist. Aufgrund des Vorhandenseins von Anti-  
15 Plättchen-Autoantikörpern findet eine verstärkte Zerstörung von Plättchen im reticuloendothelialen System (Milz, Leber, Knochenmark) statt. Diese Autoantikörper, die in etwa 75% der AITP Patienten nachgewiesen werden können, sind überwiegend gegen die Plättchenmembran-Glykoproteine (GP)  
IIb/IIIa und Ib/IX gerichtet. In einem einzigen Patienten können mehrere  
20 verschiedene Auto-Antikörper-Spezifitäten gefunden werden (vgl. z.B. Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250; Kiefel et al., Br. J. Haematol. 79 (1991), 256-262; McMillan et al., Blood 70 (1987), 1040 und Fujisawa et al., Blood 79 (1991); 1441). Die Charakterisierung von  
Bindeepitopen und die Ermittlung der pathogenetischen Signifikanz der  
25 Autoantikörper bleibt jedoch schwierig aufgrund der beschränkten Menge an Autoantikörpern, die aus AITP Patienten erhältlich sind. Unter Verwendung der Hybridomatechnik konnten nur wenige humane monoklonale Antikörper aus Lymphozyten von AITP Patienten erhalten werden, die mit GPIIb/IIIa reagieren (Kunicki et al., Hum. Antibodies Hybridomas 1 (1990),  
30 83-95).

Auch bei gesunden Personen wurde das Auftreten natürlicher Autoantikörper gegen verschiedene Selbstantigene berichtet, beispielsweise gegen intrazelluläre und zytoskelettale Komponenten humaner Plättchen (Guilbert et al., J. Immunol. 128 (1982), 2779-2787; Hurez et al., Eur. J. Immunol. 23 (1993), 783-789 und Pfueller et al., Clin. Exp. Immunol. 79 (1990), 367-373). Einige dieser im Serum gesunder Personen beobachteten Autoantikörper können auch gegen Plättchenmembranproteine gerichtet sein (Souberbielle, Eur. J. Haematol. 56 (1996), 178-180). Die Rolle dieser natürlichen Autoantikörper sowie ihre Beziehung zu Krankheits-assoziierten Autoantikörpern ist jedoch noch unbekannt.

Zur Behandlung von AITP können Corticosteroide eingesetzt werden. Etwa die Hälfte der Patienten reagiert auf eine Verabreichung von Prednison innerhalb von 4 Wochen, Langzeitremissionen werden jedoch nur selten gefunden. Bei Patienten, die starke Blutungen oder extrem geringe Plättchenzahlen aufweisen, wird als Notfallbehandlung die Verabreichung hoher Dosen von intravenösem Immunglobulin (IVIgG) empfohlen. Nach dieser Behandlung folgt ein schneller, aber üblicherweise nur vorübergehender Anstieg der Plättchenzahl bei den meisten Patienten. Die Wirkmechanismen von Corticosteroiden sowie von IVIgG bei der Behandlung der AITP sind noch unbekannt. Durch Untersuchungen von Berchtold et al., (Blood 74 (1989), 2414-2417 und Berchtold und Wenger, Blood 81 (1993), 1246-1250) ist bekannt, daß die Bindung von Autoantikörpern an Plättchen-Glykoproteine durch antiidiotypische Antikörper in IVIgG gehemmt werden kann.

Das der vorliegenden Anmeldung zugrundeliegende Problem besteht darin, neue DNA Sequenzen zu identifizieren, welche für die Bindung von Autoantikörpern an GPIIb/IIIa verantwortlich sind. Auf diese Weise können neue pharmazeutische Präparate bereitgestellt werden, welche zur Verbesserung der Diagnose und Therapie von AITP eingesetzt werden können.

Die Identifizierung von Bindesequenzen aus Autoantikörpern gelang überraschenderweise nach Herstellung einer kombinatorischen Phagemid-Displaybibliothek von schweren und leichten Ketten humaner Antikörper unter Verwendung peripherer zirkulierender B-Zellen eines gesunden 5 humanen Spenders. Nach Präsentation humaner schwerer und leichter Antikörper Fab-Fragmente an der Oberfläche des filamentösen Phagen M13 konnten Phagen-Klone identifiziert werden, welche eine spezifische Bindung an GPIIb/IIIa zeigen.

10 Hierzu wurde die Phagemid-Bibliothek aufeinanderfolgend mit thrombasthetischen Plättchen ohne GPIIb/IIIa (negative Selektion) und normalen Plättchen (positive Selektion) in Kontakt gebracht. Nach mehreren Runden der Selektion und Amplifikation durch Infektion von E.coli wurden 23 Klone erhalten, die an den GPIIb/IIIa Komplex binden können. Inhibierungsstudien 15 unter Verwendung Pools monoklonaler Antikörper gegen GPIIb/IIIa ergaben zwei Gruppen von Klonen: Beide Gruppen wurden durch monoklonale Antikörper, die spezifisch für den GPIIb/IIIa Komplex waren, inhibiert, und eine Gruppe auch durch einen GPIIb spezifischen monoklonalen Antikörper. Diese Befunde wurden durch DNA-Analyse der Klone bestätigt, die das 20 Vorhandensein von 2 unterschiedlichen Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klonen ergab. Diese Ergebnisse zeigen, daß 2 GPIIb/IIIa spezifische Phagen-Klone, d.h. Autoantikörper, aus dem Genom einer gesunden Person kloniert werden können und daß diese Klone Konformationsepitope des GPIIb/IIIa Komplexes erkennen können. Durch Inhibierungsstudien wurde weiterhin festgestellt, 25 daß beide Phagen-Klone die Bindung von Plättchen-assoziierten Autoantikörpern aus Patienten mit AITP an gereinigtes GPIIb/IIIa hemmen und somit vermutlich AITP-assoziierte Epitope von GPIIb/IIIa erkennen. Da die Phagen-Klone die Antigenbindesequenzen natürlicher Autoantikörper enthalten, die aus dem Genom einer gesunden Person stammen, kann dieser 30 Befund zu neuen Erkenntnissen über den Ursprung Plättchen-assozierter Autoantikörper in AITP führen.

Darüber hinaus ist es unter Verwendung der erfindungsgemäßen Phagen-Klone möglich, rekombinante antiidiotypische Antikörper gegen Anti-GPIIb/IIIa Autoantikörper zu erzeugen, wobei die Anti-GPIIb/IIIa Phagen-Klone als Antigen verwendet werden. Die auf diese Weise erhältlichen 5 rekombinanten antiidiotypischen Antikörper stellen eine interessante klinische Alternative zur Verwendung von IVIgG dar.

Die Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen der identifizierten Phagen-Klone sind in den Sequenzprotokollen SEQ ID No.1 bis 8 10 (Autoantikörper) bzw. SEQ ID No. 9 bis 18 (antiidiotypische Antikörper) dargestellt.

### I. Autoantikörper

- 15 Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für Autoantikörper kodieren. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:
- 20 (a) einer für die Aminosäuresequenz:  
V L P F D P I S M D V (I)  
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:  
A L G S W G G W D H Y M D V (II)  
25 kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert und
- (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit 30 einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt weiterhin vorzugsweise eine CDR1-Region ausgewählt aus

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

G Y S W R (III)

5 kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

S Y A M H (IV)

kodierenden Nukleotidsequenz und

- 10 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

D I S Y S G S T K Y K P S L R S (V)

kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

20 V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G (VI)

kodierenden Nukleotidsequenz und

- 25 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- 30 (a) einer für die Aminosäuresequenz:

A T W D D G L N G P V (VII)

- kodierenden Nukleotidsequenz,  
15 (b) einer für die Aminosäuresequenz:  
A A W D D S L N G W V (VIII)  
kodierenden Nukleotidsequenz,  
5 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit  
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von  
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)  
kodiert und  
10 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit  
einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIb/IIIa kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR1-Region ausgewählt aus:

- 15 (a) einer für die Aminosäuresequenz:  
S G S S S N I R S N P V S (IX)  
kodierenden Nukleotidsequenz,  
16 (b) einer für die Aminosäuresequenz:  
S G S S S N I G S N T V N (X)  
kodierenden Nukleotidsequenz und  
20 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit  
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von  
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b)  
kodiert.

25 Darüber hinaus umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise  
weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:  
G S H Q R P S (XI)  
kodierenden Nukleotidsequenz,  
30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:  
S N N Q R P S (XII)  
kodierenden Nukleotidsequenz und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90 % zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

5

## II. Antiidiotypische Antikörper

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für antiidiotypische Antikörper kodieren. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert, und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

VBD|GYBV|STETED| (XIII)

15 kodierenden Nukleotidsequenz,

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

D G R S G S Y A R F D G M D V (XIV)

kodierenden Nukleotidsequenz.

- (c) einer für die Aminosäuresequenz:

MGSSVVATYNAFDI

(xvi)

kodierenden Nukleotidsequenz.

- (d) einer für die Aminosäuresequenz:

DADGDGFSPYYFPY (XVI)

kodierenden Nukleotidsequenz

- 25 (e) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), (b), (c) oder (d) kodiert und

30 (f) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt weiterhin vorzugsweise eine CDR1-Region ausgewählt aus: einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen N F A M S, S Y T M H oder D Y A L H, S H Y W S kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu einer der zuvor genannten Aminosäuresequenzen kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine  
10 CDR2- Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäure-  
sequenzen G I S G G G L L T H Y A (D/N) S V K G, L I S Y D G S N K Y Y  
A D S V K G, G I S W D S T S I G Y A D S V K G oder F I Y D G A R T R  
F N P S L R S kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz,  
die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80%  
15 und vorzugsweise von mindestens 90% zu einer der zuvor genannten  
Aminosäuresequenzen kodiert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- 25 (a) einer für die Aminosäuresequenz  
C S Y V H S S T N (XVII)  
kodierenden Nukleotidsequenz,  
(b) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit  
einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise  
mindestens 90% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) kodiert  
und  
30 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit  
einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen  
GPIIb/IIIa kodiert.

Vorzugsweise umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure weiterhin eine CDR1-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigte Aminosäuresequenz T G T S S A I G N Y N F V P kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise von mindestens 90% zur der zuvor genannten Aminosäuresequenz kodiert.

Darüber hinaus umfaßt die erfindungsgemäße Nukleinsäure vorzugsweise weiterhin eine CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigte Aminosäuresequenz E G S K R P S kodierenden Nukleotidsequenz und einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% und vorzugsweise mindestens 90% zu der zuvor genannten Aminosäuresequenz kodiert.

Unter dem Begriff "funktionelles Derivat einer Kette eines humanen Antikörpers" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid zu verstehen, das mindestens eine CDR3-Region der schweren oder/und leichten Kette wie vorstehend definiert umfaßt und zusammen mit der jeweiligen komplementären Kette des humanen Antikörpers (oder einem Derivat einer solchen Kette) ein Antikörperderivat bilden kann, das eine äquivalente Erkennungsspezifität für ein Antigen wie der nicht derivatisierte Antikörper besitzt. Vorzugsweise weist ein derartiges Antikörperderivate eine Bindungskonstante von mindestens  $10^{-6}$  l/mol, vorzugsweise von mindestens  $10^{-8}$  l/mol für das jeweilige Antigen auf.

Die Herstellung funktioneller Derivate von Ketten eines humanen Antikörpers kann beispielsweise durch Deletion, Substitution oder/und Insertion von Abschnitten des für das jeweilige Polypeptid kodierenden Gens durch rekombinante DNA-Techniken erfolgen.

Besonders bevorzugte funktionelle Derivate von Antikörperketten oder Antikörper sind Einzelkettenantikörper, die beispielsweise aus den variablen

Domänen der H- und L-Kette sowie gegebenenfalls einer konstanten Domäne zusammengesetzt sein können. Die Herstellung solcher Konstrukte ist bei Hoogenboom et al., Immunol. Rev. 130 (1992), 41-68; Barbas III, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119 und Plückthun,  
5 Immunochemistry (1994), Marcel Dekker Inc., Kapitel 9, 210-235 beschrieben.

Unter dem Begriff "äquivalente Bindefähigkeit" im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine gleiche Bindeaffinität oder/und Spezifität, d.h. Epitoperkennung wie in den konkret offenbarten Sequenzen zu verstehen.  
10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Dieser Vektor kann ein prokaryontischer Vektor oder ein eukaryontischer  
15 Vektor sein. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind Plasmide, Cosmide und Bakteriophagen. Derartige Vektoren sind beispielsweise bei Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, in den Kapiteln 1 bis 4 ausführlich beschrieben. Vorzugsweise ist ein prokaryontischer Vektor ein Plasmid oder  
20 ein Phage.

Andererseits kann der Vektor auch ein eukaryontischer Vektor sein, z.B. ein Hefevektor, ein Insektenvektor (Baculovirus) oder ein Säugervektor (Plasmidvektor oder viraler Vektor). Beispiele für eukaryontische Vektoren sind bei Sambrook et al., supra, Kapitel 16 und Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung für die Gentechnologie (1985), VCH Verlagsgesellschaft insbesondere Kapitel 5, 8 und 10, beschrieben.  
25

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure exprimiert, oder eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Die Zelle kann eine prokaryontische Zelle (z.B. eine  
30

gram-negative Bakterienzelle, insbesondere E.coli) oder eine eukaryontische Zelle (z.B. eine Hefe-, Pflanzen- oder Säugerzelle) sein. Beispiele für geeignete Zellen und Verfahren zum Einführen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in derartige Zellen finden sich den obigen Literaturstellen.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid, das von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert ist, insbesondere ein rekombinantes Polypeptid. Besonders bevorzugt enthält das Polypeptid die variable Domäne der H- oder/und L-Kette eines humanen Antikörpers.

10

Besonders bevorzugt ist ein Polypeptid, das Antikörpereigenschaften aufweist und aus einer schweren Kette oder einem funktionellen Derivat davon sowie aus einer leichten Kette oder einem funktionellen Derivat davon als Untereinheiten aufgebaut ist. Das Polypeptid kann aus zwei separaten 15 Ketten zusammengesetzt sein oder als Einzelkettenpolypeptid vorliegen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid, der gegen ein für die Erkennung des Antigens verantwortliche Region des Polypeptids gerichtet ist. Dieser 20 Antikörper kann ein polyklonales Antiserum, ein monoklonaler Antikörper oder ein Fragment eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers (z.B. ein Fab-, F(ab)<sub>2</sub>-, Fab'- oder F(ab')<sub>2</sub> Fragment) sein. Vorzugsweise ist der Antikörper gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten Antikörperkette des erfindungsgemäßen Polypeptids oder einen Bereich 25 davon gerichtet. Derartige Antikörper können nach an sich bekannten Methoden durch Immunisierung eines Versuchstiers mit einem Peptid oder Polypeptid, welches eine erfindungsgemäße CDR3-Region enthält, und Gewinnung der resultierenden polyklonalen Antikörper aus dem Versuchstier erhalten werden. Weiterhin können monoklonale Antikörper durch Fusion einer Antikörper-produzierenden B-Zelle des Versuchstiers mit einer Leukämiezelle nach der Methode von Köhler und Milstein oder einer 30 Weiterentwicklung davon erhalten werden. Darüber hinaus können

rekombinante Antikörper, die gegen die CDR3-Region des erfindungsgemäß Polypeptids gerichtet sind, auch durch Musterung einer geeigneten Phagemid-Bibliothek, z.B. einer Phageimnid-Bibliothek aus einem gesunden humanen Spender, erhalten werden, wobei als Antigen ein erfindungsgemäßes Polypeptid verwendet wird.

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Nukleinsäure, einen Vektor, ein Polypeptid, einen Antikörper oder eine Zelle wie zuvor genannt, als aktive Komponente, gegebenenfalls zusammen mit anderen aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz- oder Trägerstoffe enthält.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zur Herstellung eines diagnostischen oder therapeutischen Mittels eingesetzt werden. Beispiele für diagnostischen Anwendungen sind die Diagnose von AITP oder einer Prädisposition für AITP. Eine weitere bevorzugte diagnostische Anwendung ist die Überwachung des Krankheitsverlaufs bei AITP.

Der Einsatz der pharmazeutischen Zusammensetzung als diagnostisches Mittel kann beispielsweise den Nachweis einer B-Zellsubpopulation umfassen, welche ein erfindungsgemäßes Polypeptid als Antikörper exprimiert. Der Nachweis dieses Antikörpers kann beispielsweise auf Nukleinsäureebene, z.B. durch einen Nukleinsäure-Hybridisierungs-Assay gegebenenfalls mit vorgeschalteter Amplifikation erfolgen. Andererseits kann der Nachweis auch auf Proteinebene durch einen Immunoassay unter Verwendung von spezifisch mit dem Polypeptid reagierenden Antigenen oder Antikörpern erfolgen.

Weiterhin kann die erfindungsgemäß pharmazeutische Zusammensetzung auch auf therapeutischem Gebiet angewandt werden, insbesondere zur Prävention oder Therapie von AITP. Diese therapeutische Anwendung kann beispielsweise darauf beruhen, daß eine Stimulierung der Produktion von

Anti-Autoantikörpern erfolgt. Hierzu kann beispielsweise das erfindungsgemäße Autoantikörper-Polypeptid einem Patienten verabreicht werden, wodurch die Bildung von antiidiotypischen Antikörpern hervorgerufen oder/und stimuliert wird. Diese Verabreichung kann dabei nach üblichen Immunisierungsprotokollen (Fox et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 279 (1996), 1000-1008; Whittum-Hudson et al., Nat. Med. 2 (1996), 1116-1121; Jardieu, Curr. Opin. Immunol. 7 (1995), 779-782) erfolgen. Andererseits kann die Expression von Antikörpergenen spezifisch durch Verabreichung geeigneter Antisense-Nukleinsäuren gehemmt werden. Das erfindungsgemäße antiidiotypische Antikörper-Polypeptid kann einem Patienten verabreicht werden, um eine direkte Hemmung der Autoantikörper-Aktivität zu erreichen.

Weiterhin wird die Erfindung durch nachfolgende Beispiele, Figuren und Sequenzprotokolle erläutert. Es zeigen:

- SEQ ID No. 1 Die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Antikörpers (Phagemidklon PDG7), wobei Framework-Region (FR)1 von bp 1-90, Komplement-bestimmende Region (CDR)1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-291, CDR3 von bp 292-324 und FR4 von bp 325-357 reicht,
- SEQ ID No. 2 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-108 und FR4 von A.S. 109-119 reicht,
- SEQ ID No. 3 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PDG7), wobei FR1

von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261, CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,

- 5 SEQ ID No. 4 die Aminosäuresequenz zu der in SEQ ID No. 3 angegebenen Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von A.S. 49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98 und FR4 von A.S. 99-11 reicht,

10 SEQ ID No. 5 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PDG13), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-109, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-336 und FR4 von bp 337-369 reicht,

15 SEQ ID No. 6 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 5 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-112 und FR4 von A.S. 113-123 reicht,

20 SEQ ID No. 7 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon PGD13), wobei FR1 von bp 1-60, CDR1 von bp 61-99, FR2 von bp 100-144, CDR2 von bp 145-165, FR3 von bp 166-261, CDR3 von bp 262-294 und FR4 von bp 295-333 reicht,

25 SEQ ID No. 8 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 7 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-33, FR2 von A.S. 34-48, CDR2 von A.S.

49-55, FR3 von A.S. 56-87, CDR3 von A.S. 88-98 und  
FR4 von A.S. 99-111 reicht,

SEQ ID No. 9 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-gemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X16), wobei  
5 FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp  
106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-288,  
CDR3 von bp 289-336 und FR4 von bp 337-369 reicht,

10 SEQ ID No. 10 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 9 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-96, CDR3 von A.S. 97-112 und FR4 von A.S. 113-123 reicht,

15 SEQ ID No. 11 die Nukleotidsequenz der L-Kette eines erfindungs-gemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X16), wobei  
20 FR1 von bp 1 bis 60, CDR1 von bp 61-102, FR2 von bp 103-147, CDR2 von 148-168, FR3 von bp 169-264, CDR3 von 265-291 und FR4 von bp 292-375 reicht,

25 SEQ ID No. 12 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 11 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-20, CDR1 von A.S. 21-34, FR2 von A.S. 35-49, CDR2 von A.S. 50-56, FR3 von A.S. 57-88, CDR3 von A.S. 89-97 und FR4 von A.S. 89-125 reicht,

30 SEQ ID No. 13 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungs-gemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X20), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-195, FR3 von bp 196-291,

CDR3 von von bp 292-333 und FR4 von bp 334-366 reicht,

SEQ ID No. 14 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 13 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1

5 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-65, FR3 von A.S. 66-97, CDR3 von A.S. 98-111 und FR4 von A.S. 112-122 reicht,

10 SEQ ID No. 15 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X39), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von pb 148-198, FR3 von bp 199-294, CDR3 von bp 295-339 und FR4 von 340-372 reicht,

15 SEQ ID No. 16 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 15 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1-30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-98, CDR3 von A.S. 99-113 und FR4 von A.S. 114-124 reicht,

20 SEQ ID No. 17 die Nukleotidsequenz der H-Kette eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Phagemidklon AI-X40), wobei FR1 von bp 1-90, CDR1 von bp 91-105, FR2 von bp 106-147, CDR2 von bp 148-198, FR3 von bp 199-297, CDR3 von bp 298-339 und FR4 von bp 340-372 reicht und

25 SEQ ID No. 18 die Aminosäuresequenz der in SEQ ID No. 17 dargestellten Nukleotidsequenz, wobei FR1 von A.S. 1 bis 30, CDR1 von A.S. 31-35, FR2 von A.S. 36-49, CDR2 von

A.S. 50-66, FR3 von A.S. 67-99, CDR3 von A.S. 100-  
113 und FR4 von A.S. 114-124 reicht,

Figur 1 die Hemmung der Bindung von Autoantikörper-Phabs (PDG-X)  
5 an GPIIb/IIIa durch Zusatz des antiidiotypischen Antikörper-  
Phab AI-X17.

### Beispiele

10 1. Identifizierung von Autoantikörpersequenzen

#### 1.1. Gewinnung von Autoantikörpern

Autoantikörper von 12 Patienten mit AITP (8 mit primärer AITP, 3 mit AITP  
15 assoziiert mit SLE, 1 mit AITP assoziiert mit Sjögren's Syndrom) wurden  
durch Inkubation von Patientenplasma über Nacht mit gereinigtem GPIIb/IIIa  
bei 4°C und anschließende Elution in 0,2 mol/l Glycin und 0,15 mol/l NaCl  
pH 2,5 für 15 min bei Raumtemperatur erhalten. Nach Zentrifugation für 30  
min bei 100.000 g wurde der Überstand mit 1 mol/l Tris-HCl neutralisiert  
20 und über Nacht gegen Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) dialysiert.

Zum Zeitpunkt der Plasmaentnahme waren alle Patienten thrombozytopenisch (Plättchenzahl < 150 x 10<sup>9</sup>/l) und hatten normale oder vergrößerte  
25 Megakaryozyten im Knochenmark und waren frei von anderen nachweisbaren Formen der Immunthrombozytopenie.

#### 1.2. Gewinnung gereinigter Antigene

Als Antigene wurden gereinigtes GPIIb/IIIa, ein zytoplasmatisches Fragment  
30 von GPIIIa (Aminosäuren 721-744) und ein extrazelluläres Fragment von  
GPIIIa (Aminosäuren 468-690) verwendet (Beardsley, Blut 59 (1989), 47-51  
und Phillips et al., Methods Enzymol. 215 (1992), 244-263).

### **1.3. Gewinnung von Plättchen zum Panning und Immunoblotting**

- Aus EDTA-antikoagulierten Blutproben gesunder humander Spender wurde Plättchen-angereichertes Plasma durch differenzielle Zentrifugation  
5 hergestellt. Die Plättchen wurden durch Zentrifugation bei 2000 g für 15 min isoliert, sechsmal in Zitronensäurepuffer (pH 6,2) mit 50 mmol/l Natriumcitrat, 100 mmol/l NaCl und 125 mmol/l Dextrose gewaschen und schließlich im gleichen Puffer resuspendiert.
- 10 Thrombasthenische Plättchen wurden aus einem 14 Jahre alten an Thrombasthenie Glanzmann Typ I erkrankten Jungen unter Verwendung des gleichen Anreicherungsprotokolls erhalten.

### **1.4. Monoklonale Antikörper**

- 15 Es wurden murine monoklonale Antikörper verwendet, welche die komplexierte Form von GPIIb/IIIa erkennen, sowie Antikörper, die selektiv GPIIb oder GPIIIa erkennen. Diese Antikörper wurden mit üblichen Immunisierungsprotokollen unter Verwendung der entsprechenden Antigene  
20 gewonnen und sind nicht AITP-assoziiert. Die Gewinnung solcher Antikörper ist bei Kouns et al. (J. Biol. Chem. 267 (1992), 18844-18851), Steiner et al. (Biochim. Biophys. Acta 1119 (1992), 12-21) und Häring et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 4837-4841) beschrieben.

25 **1.5. Phagemid-Bibliothek**

- Eine kombinatorische Fab-Bibliothek wurde nach der von Vogel et al. (Eur. J. Immunol. 24 (1994), 1200-1207) beschriebenen Methode hergestellt, wobei periphere Blutzlymphozyten aus einem gesunden präimmunisierten  
30 humanen Spender verwendet wurden. Alle Enzyme und Oligonukleotide wurden von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland) mit Ausnahme der Taq Polymerase (Perkin Elmer, NJ, USA) bezogen. Die Primer

für die PCR-Amplifikation der H- und L-Ketten der Fab-Moleküle, der VCSM13 Helperphage und der Escherichia coli Stamm XL-Blue wurden von Stratacyte (La Jolla, CA, USA) bezogen. Das Phagemid pComb3 wurde vom Scripps Research Institute (La Jolla, CA, USA) bezogen. Die Klonierung, die  
5 Transformation in XL-Blue-Zellen und die Herstellung von Phabs erfolgte wie von Barbas III und Lerner, Methods: Companion Methods Enzymol. 2 (1991), 119 beschrieben. Die Phabs wurden mit 4% (w/v) Polyethylen-  
glykol 8000 und 3% (w/v) NaCl präzipitiert und in PBS pH 7,4 resuspendiert. Die resultierende Expressionsbibliothek enthält  $1 \times 10^7$  Spezifitäten.

10

### 1.6. Isolierung von GPIIb/IIIa-spezifischen Phabs

GPIIb/IIIa-spezifische Phabs wurden durch insgesamt 5 Runden einer Affinitätsselektion ("Panning") hergestellt. Nach Präabsorption (negative  
15 Selektion) mit  $5 \times 10^7$  thrombasthenischen Plättchen wurden die Phabs mit  $10^8$  normalen Plättchen für 45 min inkubiert (positive Selektion). Gebundene Phabs wurden dann mit 0,05 mol/l Natriumcitrat pH 2,5 eluiert und mit 1 mol/l Tris-Puffer neutralisiert. Nach jeder "Panning"-Runde wurde die Anreicherung von GPIIb/IIIa spezifischen Phabs durch Titration der  
20 Phagenkolonie-bildenden Einheiten verfolgt. Nach fünf Selektionsrunden wurde eine Anreicherung der eluierten Phabs um den Faktor von mehr als 100 gefunden.

Der nach der vierten Selektionsrunde erhaltene Pool von Phabs wurde näher auf seine GPIIb/IIIa Spezifität analysiert. Hierzu wurden 40 Phab-Klone zufällig ausgewählt und ihre Bindespezifität in einem Immunodot-Assay ermittelt. 1 µl normale und thrombasthenische Plättchen ( $10^9$  ml) sowie gereinigtes GPIIb/IIIa (500 µg/ml) wurden auf Nitrozellulosestreifen (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) getropft. Die Streifen wurden in TBS mit 0,15% Casein (TBS-Casein) blockiert und dann über Nacht mit den in TBS-Casein verdünnten Phabs inkubiert. Nach drei Waschungen mit TBS-0,1% Tween 20 (TBS-Tween) wurden die gebundenen Phabs mit 4-Chlor-1- $\alpha$ -

naphthol (Merck, Darmstadt, Deutschland) nach Inkubation mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem polyklonalem Kaninchen-Anti-Phage-Antikörper (Vogel et al., supra) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein nachgewiesen.

5

Die Bindung von Phabs an Plättchen und gereinigtes GPIIb/IIIa wurde auch nach Denaturierung der Proteine durch Erhitzen (70°C) oder durch Säurebehandlung (pH 2 mit 0,5 N HCl) vor dem Auftröpfen getestet.

- 10 Von den 40 zufällig ausgewählten Klonen reagierten 23 (57,5%) mit GPIIb/IIIa, während 17 keine Bindung zeigten. Nach Denaturierung des Antigens durch Hitze oder pH 2 vor der Inkubation wurde keine Bindung von Anti-GPIIb/IIIa an Phabs beobachtet, wodurch gezeigt wird, daß intaktes GPIIb/IIIa für die Phab-Bindung notwendig ist. Fab-Bestimmung an negativen  
15 Phabs zeigte keine Fab-Moleküle bei 15 Klonen (88 %). Die zwei Fab-positiven Klone ohne Bindung an GPIIb/IIIa könnten eine geringe Bindeaffinität für GPIIb/IIIa aufweisen.

### 1.7. Fab Analyse

20

- Zum Test der positiven Phabs auf kappa ( $\kappa$ ), lambda ( $\lambda$ ) und Fd-Ketten wurden die Anti-GPIIb/IIIa Phabs auf Nitrozellulose getropft. Die Filter wurden 4 Stunden lang mit Peroxidase-markiertem Maus-anti-Human- $\lambda$ -, - $\kappa$ - (The Binding Site Limited, Birmingham, England) und -Fd-Antikörper (aus der  
25 Myelomazelllinie HP6045, ATCC1757, Rockville, MD, USA) verdünnt 1:1000 in TBS-Casein inkubiert und mit Chemilumineszenz (ECL, Amersham, Schweiz, Zürich, Schweiz) entwickelt. Ein Test von 15 zufällig ausgewählten Anti-GPIIb/IIIa Fab-Klonen auf  $\kappa$ ,  $\lambda$  und Fd-Ketten ergab das Vorhandensein einer Fd-Kette in 12 Klonen (80%) und der  $\lambda$ -Kette in allen  
30 Klonen.

Eine quantitative Bestimmung der Fab-Bindung an GPIIb/IIIa auf Plättchen erfolgt durch Präinkubation gepoolter Phabs mit Plättchen in verschiedenen Konzentrationen. Der Überstand wurde dann durch ein Immunodotverfahren analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß 1 bis  $3 \times 10^4$  Phabs pro Plättchen binden. Dies weist darauf hin, daß ungefähr 10 bis 50 % der GPIIb/IIIa Moleküle pro Plättchen durch Phabs besetzt werden können.

### 1.8. Charakterisierung der Phab-Bindepitope

Die Epitopspezifität von Phabs wurde durch einen Inhibitionstest unter Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper (siehe Punkt 4) bestimmt. 1  $\mu\text{l}$  aufgetaute normale und thrombasthenische Plättchen ( $10^9/\text{ml}$ ), gereinigtes GPIIb/IIIa ( $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ein Peptidfragment von GPIIIa (Aminosäuren 468-690,  $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und der cytoplasmatische Abschnitt von GPIIb/IIIa ( $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ) wurden jeweils in Doppelansätzen auf Nitrozellulosestreifen aufgetropft. Nach der Blockierung wurden die Phab-Klone ( $0,4\mu\text{g}/\text{ml}$  Fab) über Nacht mit oder ohne monoklonalen Antikörper ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Die gebundenen Phabs wurden durch Peroxidase-markierten Anti-PHage-Antikörper und 4-Chlor-1- $\alpha$ -naphthol nachgewiesen.

Bei diesen Untersuchungen wurden 2 Gruppen von Phabklonen identifiziert. Gruppe A (5 Klone) wurde mäßig durch einen Pool aller Antikörper, aber stark durch GPIIb/IIIa-Komplex-spezifische Antikörper inhibiert. Anti-GPIIb Antikörper hatten keinen Effekt. Gruppe B (10 Klone) wurde vollständig durch den Pool aller Antikörper, aber weniger durch den komplexspezifischen Antikörper und auch durch den IIb spezifischen Antikörper inhibiert. Keine Gruppe zeigte Reaktion mit GPIIIa spezifischen Antikörpern. Gleiche Ergebnisse wurden bei Verwendung von Plättchen oder gereinigtem GPIIb/IIIa als Antigen erhalten. Es wurde keine Phab-Bindung an das cytoplasmatische Peptid oder das extrazelluläre Fragment von GPIIIa gefunden.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Hemmung der Phab-Bindung (Mittelwert $\pm$ SD in %)			
Pools monoklonaler Antikörper für Inhibition	Gruppe A Phab Klone (n = 5)	Gruppe B Phab Klone (n = 10)	
	Plättchen	Gereinigtes GPIIb/IIIa	Plättchen
(1) Anti-GPIB	0	0	49,1 $\pm$ 5,9
(2) Anti-GPIIIa	0	0	49,4 $\pm$ 9,2
(3) Anti GPIIb/IIIa- Komplex	77,8 $\pm$ 2,9	43,6 $\pm$ 2,1	58,6 $\pm$ 4,4
Pool aller Antikörper (1)-(3)	47,6 $\pm$ 7,7	33,0 $\pm$ 10,8	95,9 $\pm$ 2,7
			97,5 $\pm$ 7,5

### 1.9. Inhibierungsuntersuchungen

- Die Blockierung der Bindung von Autoantikörpern aus Patienten an GPIIb/IIIa  
5 durch die gefundenen anti-GPIIb/IIIa Phabs wurde durch Inhibierungsunter-  
suchungen ermittelt. Hierzu wurden zwei der wie zuvor beschrieben identifi-  
zierten Phabklone (PDG16, PDG31) verwendet.
- Serielle Verdünnungen von 1:3 bis 1:1000 der eluierten Autoantikörper aus  
10 Patienten wurden auf die Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa analysiert. Hierzu  
wurde ein Immunodotassay durchgeführt. 100 ng gereinigtes GPIIb/IIIa  
wurde in jeweils dreifachen Ansätzen auf Nitrozellulosestreifen getropft und  
die Filter mit TBS-Casein blockiert. Zur Blockierung der AITP Autoantikörper-  
Bindung an GPIIb/IIIa durch Phabs wurden die Streifen 1 h lang mit  $10^{11}$   
15 Phabs und anschließend 4 h lang mit AITP Autoantikörpern in variablen  
Verdünnungen inkubiert. Gebundene Autoantikörper wurden durch  
Peroxidase-markierten Anti-human-IgG-Fc Antikörper und ECL nach-  
gewiesen.
- 20 Die Bindung von Autoantikörpern aus 8 AITP Patienten wurde durch Anti-  
GPIIb/IIIa Phabs inhibiert. Der Inhibierungsbereich war 10 bis 46 %, 32 bis  
60 % und 20 bis 67 % für PTG16, PTG31 bzw. den Pool der beiden Phabs.  
Die Bindung von Autoantikörpern aus 4 AITP Patienten wurde durch diese  
Phabs nicht verändert. In beiden Gruppen waren Autoantikörper von  
25 Patienten mit primärer und krankheitsassoziiierter AITP.

Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

AITP-Patient	Hemmung der Bindung an gereinigtes GPIIb/IIIa durch (%)		
	Phab-Klon PDG16	Phab-Klon PDG31	Pool beider Phab Klonen
WS16	13	19	40
WS37	14	20	36
KC	24	22	28
KK	22	22	40
KP	10	36	60
WS2	25	55	65
KS	60	56	64
KL	0	15	10
KG	0	0	0
KM	0	0	0
KE	0	0	0
KR	0	0	0

#### 1.10. DNA Sequenzanalyse

Plasmid DNA wurde aus vier Phabklonen der Gruppe A und 4 Klonen der Gruppe mit dem Nukleobond® AX Reinigungskit PC 20 (Macherey-Nagel AG, Oensingen, Schweiz) gereinigt.

Die Nukleinsäuresequenzierung erfolgte auf einen ABI373A Sequenzierring unter Verwendung eines PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit. Die Primer wurden von Microsynth, Balgach, Schweiz bezogen. Zur Sequenzierung der H Kette wurden folgende Primer verwendet: Chy1 (5'-CGC TGT GCC CCC AGA GGT-3') und PCH (5'-GGC CGC AAA TTC TAT TTC AAG G-3'). Zur Sequenzierung der L-Kette wurden folgende Primer verwendet: Cλ (5'-GAG ACA CAC CAG TGT GGC-3'), Cκ (5'-CAC AAC AGA GGC AGT TCC-3') und PCL(5'-CTA AAC TAG CTA GTC TCC-3'). Die von der DNA Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit der GenEMBL-Genbank verglichen und Stammlinien VH und Vλ Familien zugeordnet.

Die VH und Vλ Nukleotidsequenzen der 4 Phabklone jeder Gruppe (Gruppe A: PDG7, PDG8, PDG10, PDG16; Gruppe B: PDG13, PDG17, PDG31, PTG37) wurden durch automatisierte Sequenzierung analysiert und mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen verglichen (Tabellen 3 und 4). Innerhalb jeder Gruppe war 100 % Homologie in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der H- und L-Ketten. Im Gegensatz dazu war die Homologie zwischen Gruppe A und B nur 36,9 % für die H-Kette und 81,9% für die L-Ketten-Aminosäuresequenzen.

In der H-Kette zeigen Klone der Gruppe A den höchsten Grad an Sequenzidentität mit dem Stammlinienengen VH4.11 der V<sub>H</sub>4 Familie (Sanz, et al. EMBO J. 8 (1989), 3741-3748). Es gab 7 Aminosäureunterschiede in der Frameworkregion (FR) und 8 in der Komplement-bestimmenden Region (CDR). Klone der Gruppe B unterschieden sich von der am meisten homologen Stammliniensequenz 1.9III der V<sub>H</sub>3-Familie (Berman et al., EMBO J. 7 (1988), 727-738) durch vier Aminosäuren in FR und eine in CDR.

In der L-Kette zeigten die Klone der Gruppe A und B die höchste Homologie zu der Stammliniensequenz der DPL2 der V<sub>λ</sub> I Familie (Williams und Winter, Eur. J. Immunol. 323 (1993), 1456). Es gab neun Aminosäureun-

terschiede in FR und zehn in CDR für Klone der Gruppe A und einen in FR und zwei in CDR für Klone der Gruppe B. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 3

A. Schwere Ketten		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
Klone	FR1												
VH4.1.1	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCVSGSIS	SYNS	WIRQPPGKGLEMIG	YIYYSGSTSNQFSLKLSSVTAADTAVYCAR	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYCAR	VLPFDPISMDV	VLPFDPISMDV	VLPFDPISMDV	VLPFDPISMDV	VLPFDPISMDV	VLPFDPISMDV	VLPFDPISMDV	VLPFDPISMDV
PDG7	--K-L--	--N--	--R--	--S--	--D-S---	--K-K--R-	--L--	--N--	--	--	--	--	--
PDG8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PDG10	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PDG16	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
1.9.III		QYQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGETFS		SYGMH		WYRQAPGKGLENVVA		VISYDGSNKYYADSVKG		RTTISRDNSRNKTYLQMNLSRAEDTAVYCAK		ALGSWGGMDIIMYMDV	
PDG13	--K-L--	--	--A--	--	--	--	--	--	--	--R--	--	--	--
PDG17	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PDG31	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PDG37	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
M85255	--Q-V--	--	--	--	--	--	--	--	--	--T--	--	--	--
B. Leichte Ketten		CDR1		FR2		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
Klone	FR1												
DPL2	VLTQPPSASGTPQRVTISC	SGSSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLY	SNNQRPS	GVPRDRFGSKSGTSASLAISGLOSEDEADYYC	AAWDDSLNG							
PDG7	-V--	--W--	--R--P-S	--H-V---	GSH-----	-T-----	-G-----	--	--	--	--	--	--
PDG8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PDG10	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PDG16	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
DPL2	VLTQPPSASGTPQRVTISC	SGSSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLY	SNNQRPS	GVPRDRFGSKSGTSASLAISGLOSEDEADYYC	AAWDDSLNG							
PDG13	-V--	--	--	--	--	--	--	--	--	--W-	--	--	--
PDG17	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PDG31	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
PDG37	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

FR: framework-Region; CDR: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (VH4.11; 1.9III; DPL2) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die abgeleitete Aminosäuresequenz für die am nächsten verwandte veröffentlichte Stammlinien-Gensequenz dar. Striche bedeuten Identität. M85255 bezieht sich auf die EMPL/GenBank Kennzeichnungsnummer und bedeutet die abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen Anti-GPIb-Autoantikörpers 2E7 (Kunicki et al., J. Autoimmun. 4 (1991), 433-446). Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVK) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

Tabelle 4 zeigt die Zuordnung von Klonen der Gruppe A und B zu bekannten Stammlinien V-Gensequenzen nach der Aminosäurehomologie

5	Schwere Kette				Leichte Kette		
	PDG- Phab- Klone	V <sub>H</sub> Familie	Stamm- liniengen	Homo- logie (%)	V <sub>L</sub> Fa- milie	Stamm- liniengen	Homo- logie (5)
10	Gruppe A: 7,8, 10, 16	V <sub>H</sub> 4	V <sub>H</sub> 4.11	84,3	V <sub>L</sub> I	DPL2	81,4
15	Gruppe B: 13, 17,31, 37	V <sub>H</sub> 3	1,9III	95,1	V <sub>L</sub> I	DPL2	97,1

## 2. Identifizierung von antiidiotypischen Antikörpersequenzen

- 20 Nach der in Beispiel 1 angegebenen Methode wurden durch die Phagemidtechnik Sequenzen für antiidiotypische Antikörper identifiziert. Dabei wurde der in Beispiel 1 selektionierte Klon PDG16 als Antigen verwendet. Eine negative Vorselektion fand nicht statt.
- 25 Es wurde ein Pool von kombinatorischen Phab-Bibliotheken, die Spezifitäten einer nichtimmunen und einer mit roten Blutzellen immobilisierten Bibliothek peripherer B-Lymphozyten und einer nichtimmunen Bibliothek von B-Lymphozyten aus Tonsillen verwendet.
- 30 Der nach der vierten Panningrunde erhaltene Pool von Phabs wurde analysiert. Hierzu wurden 40 Phab-Klone zufällig ausgewählt und ihre

Bindespezifität ermittelt. 25 der ausgewählten Klone reagierten mit Anti-GPIIb/IIIa-Phab. Diese antiidiotypischen Phab-Klone gehörten zu zwei Gruppen: Gruppe I (drei Klone) zeigte eine Reaktion ausschließlich mit Autoantikörper-Phab-Klonen der Gruppe A (PDG 7, 8, 10 und 16), während die Phab-Klone der Gruppe II (insgesamt 22 Klone) sowohl mit Phab-Klonen der Gruppen A und B, mit murinen monoklonalen Anti-GPIIb/IIIa-Antikörpern, mit gereinigtem Serumimmunglobulin (IVIgG) oder F(ab')<sub>2</sub> Fragmenten davon und mit Anti-IgE-Fab reagieren. 14 Phab-Klone (Gruppe III) reagierten mit keiner der genannten Substanzen. Ein Phab-Klon der Gruppe IV reagierte nur mit Anti-GP!b/IIIa Antikörpern. Die Ergebnisse dieser Spezifitätsuntersuchungen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Eine DNA-Sequenzanalyse von Phab-Klonen der Gruppe I (AI-X16, 17 und 24) zeigte in den für die schwere Kette kodierenden Sequenzen eine bis auf eine Aminosäure in der CDR2 Region vollständige Identität und in den für die leichte Kette kodierenden Sequenzen eine vollständige Identität. Ein Vergleich mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen zeigte ca. 85% Homologie zur H-Ketten-Sequenz VH3 und ca. 90% Homologie zur Sequenz der L-Kettenfamilie V-λII. Von den Phab-Klonen der Gruppen II, III und IV wurde eine DNA-Sequenzanalyse des H-Kettengens jeweils an einem Vertreter durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Sequenzanalyse und des Vergleichs mit bekannten Stammlinien-Gensequenzen ist in den Tabellen 6 und 7 zusammengefaßt.

Das Ergebnis einer Inhibitionsuntersuchung ist in Fig. 1 dargestellt. Es wurde gefunden, daß der Phab AI-X17 (Gruppe I) die Bindung von Autoantikörper-Phabs der Gruppe A (PDG-X) an das Glykoprotein IIb/IIIa hemmen kann.

Tabelle 5

		Bindung an						
		AIX Phab-Klone	PDG A	PDGB	anti-IgE-Fab	anti-GPIIb/IIIa mAb	SG	F(ab') <sub>2</sub>
Gruppe I								
<b>16,17,24</b>	3	+	-	-	-	-	-	
Gruppe II								
<b>1,2,3,4,5,6,7,9, 11,13,14,23,26, 27,28,29,33,35, 36,37,38,40</b>	22	+	+	+	+	+	+	
Gruppe III								
<b>8,10,12,15,18, 19,21,22,25,30, 31,32,34,39</b>	14	-	-	-	-	-	-	
Gruppe IV								
<b>20</b>	1	-	-	-	-	+	-	

Tabelle 7

**A. Schwere Ketten**

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DP47 AIX16	EVQLESGGGLVQPGGSRSLSCAASGGTFS Q-K-----H-----D	SYAMS NF-----	WYRQAPGKGLEWS -----	AISSGGGSTYYADSVKG G---G-LL-H-----	RFTISRDNSKNTLYQNSLRAEDTAVYYCAK -----N-R-V-----	VRLGYRVLSTTFDFI -----	WGQGTRTVSS -----
AIX24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AIX17	-----	-----	-----	-----	-----N-----	-----	-----
DP49 AIX39	QVQLVESGGGVVQPGRSLSCAASGGTFS --K-L-----H-----	SYGMH --T--	WYRQAPGKGLEWA -----	VISYDGSNKYYADSVKG I-----	RFTISRDNSKNTLYQNSLRAEDTAVYYCAK -----R-----K-----	DGRSGSYARFDGMVD -----	WGQGTRTVSS -----
AIX40	EVQLESGGGLVQPGGSRSLSCAASGGTFS Q-K-L-----	DYAMH --L-	WYRQAPGKGLEWS -----	GISMNSGSIGYADSVKG -----D-T-----	RFTISRDNAKNSLYQNSLRAEDTAVYYCAKD -----V-----	MGSVVATYNAFDI -----	WGQGTRTVSS -----
DP71 AIX20	QVQLQESGGCLVKPSETLSLTCTVSGGSI --K-L-----D-V--R	SYWMS -H--	WIRQPPGKGLEWIG -L-----	YIYVSGSTNNYPSLKS F---DGAR-RF---R-	RVTISVDTSRKQFSLKLSSVTAADTAVYYCGR ---SL-M-P-K---G-----S-----	DADGDGFSPYYFPY -----	WGQGIPVSYSS -----

**B. Leichte Ketten**

Klone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DPL10 AIX16	QSALTQPAVSVGSPGSIITISC VW-----	TGTSSDVGSYNTLVS -----AI-N---E-P	WYQQHPGKAPKLMY -----	EVSKRPS -G-----	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGQ@DEADYC -----E-----	CSYAGSSTF -----VH---N	WFGGGTKLTVLGQPKAAPSYTLPSS -----
AIX24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AIX17	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

FR: Framework-Region; CDR: Komplement-bestimmende Region. Die oberen Sequenzen (DP47, DP31, DP71 und DPL10) sind zu Vergleichszwecken angegeben und stellen die am nächsten verwandte bekannte Stammminisequenz dar. Striche bedeuten Identität. Für die schwere Kette sind die ersten drei Aminosäuren (QVD) durch die Vektorsequenz von pComb3 bestimmt.

Tabelle 6

AIX Phab-Klone	H-Kette			L-Kette		
	V <sub>H</sub> Familie	Stammlinien- gen	Homologie (%)	V <sub>λ</sub> Familie	Stammlinien- gen	Homologie (%)
16, 24	V <sub>H</sub> 3	DP47	88%	V <sub>λ</sub> 2	DPL10	88%
17	V <sub>H</sub> 3	DP47	87%	V <sub>λ</sub> 2	DPL10	88%
20	V <sub>H</sub> 4	DP71	81%	n.d.	n.d.	n.d.
39	V <sub>H</sub> 3	DP49	94%	n.d.	n.d.	n.d.
40	V <sub>H</sub> 3	DP31	95%			

### Ansprüche

1. Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers,  
5 ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine  
CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

(a) einer für die Aminosäuresequenz:

V L P F D P I S M D V (I)

10 kodierenden Nukleotidsequenz,

(b) einer für die Aminosäuresequenz:

A L G S W G G W D H Y M D V (II)

kodierenden Nukleotidsequenz,

15 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit  
einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäurese-  
quenz aus (a) oder (b) kodiert und

20 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit  
einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

25 2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, weiterhin umfassend eine CDR1-  
Region ausgewählt aus:

(a) einer für die Aminosäuresequenz:

G Y S W R (III)

kodierenden Nukleotidsequenz,

30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:

S Y A M H (IV)

kodierenden Nukleotidsequenz, und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), oder (b) kodiert.

5 3. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 oder 2, weiterhin umfassend eine CDR2-Region, ausgewählt aus

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

D I S Y S G S T K Y K P S L R S (M)

10 kodierenden Nukleotidsequenz.

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

VISYDGNSNKYYADSVKG M

kodierenden Nukleotidsequenz und

15

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

20 4. Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

- (a) einer für die Aminosäuresequenz:

A T W D D G L N G P V (VII)

kodierenden Nukleotidsequenz.

- (b) einer für die Aminosäuresequenz:

A A W D D S L N G W V (VIII)

30 kodierenden Nukleotidsequenz

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80 % zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert, und
- 5 (d) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an GPIIb/IIIa kodiert.

5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, weiterhin umfassend eine CDR1-Region ausgewählt aus:

- 10 (a) einer für die Aminosäuresequenz:  
S G S S S N I R S N P V S (IX)  
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 15 (b) einer für die Aminosäuresequenz:  
S G S S S N I G S N T V N (X)  
kodierenden Nukleotidsequenz, und
- 20 (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.

6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 oder 5, weiterhin umfassend eine CDR2-Region ausgewählt aus:

- 25 (a) einer für die Aminosäuresequenz:  
G S H Q R P S (XI)  
kodierenden Nukleotidsequenz,
- 30 (b) einer für die Aminosäuresequenz:  
S N N Q R P S (XIII)  
kodierenden Nukleotidsequenz, und

- (c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) oder (b) kodiert.
- 5      7. Nukleinsäure, die für die schwere Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR3-Region umfaßt, ausgewählt aus:
- (a) einer für die Aminosäuresequenz:  
10      V R D L G Y R V L S T F T F D I                  (XIV)  
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (b) einer für die Aminosäuresequenz:  
15      D G R S G S Y A R F D G M D V                  (XV)  
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (c) einer für die Aminosäuresequenz:  
20      M G S S V V A T Y N A F D I                  (XVI)  
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (d) einer für die Aminosäuresequenz:  
25      D A D G D G F S P Y Y F P Y                  (XVII)  
kodierenden Nukleotidsequenz,
- (e) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a), (b), (c) oder (d) kodiert und  
30      (f) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert.

8. Nukleinsäure nach Anspruch 7, weiterhin umfassend eine CDR1- oder/und CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen oder dazu mindestens 80% homologen Aminosäuresequenz kodierenden Nukleotidsequenz.

5

9. Nukleinsäure, die für die leichte Kette eines humanen Antikörpers, ein funktionelles Derivat oder ein Fragment davon kodiert und eine CDR 3-Region umfaßt, ausgewählt aus:

10

(a) einer für die Aminosäuresequenz:

C S Y V H S S T N (XVIII)

kodierenden Nukleotidsequenz,

15

(b) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer Homologie von mindestens 80% zu einer Aminosäuresequenz aus (a) kodiert, und

20

(c) einer Nukleotidsequenz, die für eine Aminosäuresequenz mit einer äquivalenten Bindefähigkeit an Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa kodiert.

25

10. Nukleinsäure aus Anspruch 9, weiterhin umfassend eine CDR1- oder/und CDR2-Region ausgewählt aus einer für die in Tab. 7 gezeigten Aminosäuresequenzen oder dazu mindestens 80% homologen Aminosäuresequenz kodierenden Nukleotidsequenz.

11. Vektor,

dadurch gekennzeichnet,

daß er

30

(a) mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis 6 enthält oder

- (b) mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 enthält.

5 12. Zelle,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie  
(a) eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder/und  
10 (b) eine Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und eine  
Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 exprimiert.

13. Polypeptid,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es  
(a) von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3  
oder/und einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 4 bis  
6 oder  
(b) von einer Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder 8 oder/und einer  
20 Nukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10 kodiert ist.

14. Polypeptid nach Anspruch 13,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es die variable Domäne der H-Kette oder/und die variable  
25 Domäne der L-Kette eines humanen Antikörpers umfaßt.

15. Polypeptid nach Anspruch 14,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es sowohl die variable Domäne der H-Kette als auch die variable  
30 Domäne der L-Kette umfaßt.

16. Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß es mit einer Markierungsgruppe oder einem Toxin gekoppelt ist.
- 5 17. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 13 bis  
16.
18. Antikörper nach Anspruch 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 daß er gegen die CDR3-Region der schweren oder/und leichten  
Antikörerkette des Polypeptids gerichtet ist.
19. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponente eine  
Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10, einen Vektor nach  
15 Anspruch 11, eine Zelle nach Anspruch 12, ein Polypeptid nach  
einem der Ansprüche 13 bis 16 oder einen Antikörper nach einem der  
Ansprüche 17 oder 18, gegebenenfalls zusammen mit anderen  
aktiven Komponenten sowie pharmazeutisch üblichen Hilfs-, Zusatz-  
oder Trägerstoffen enthält.
- 20 25 20. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10  
eines Vektors nach Anspruch 11, einer Zelle nach Anspruch 12,  
eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 13 bis 16, eines  
Antikörpers nach Anspruch 17 oder 18 oder einer pharmazeutischen  
Zusammensetzung nach Anspruch 19 zur Herstellung eines Mittels  
für die Diagnose oder für die Behandlung oder Prävention von AITP.

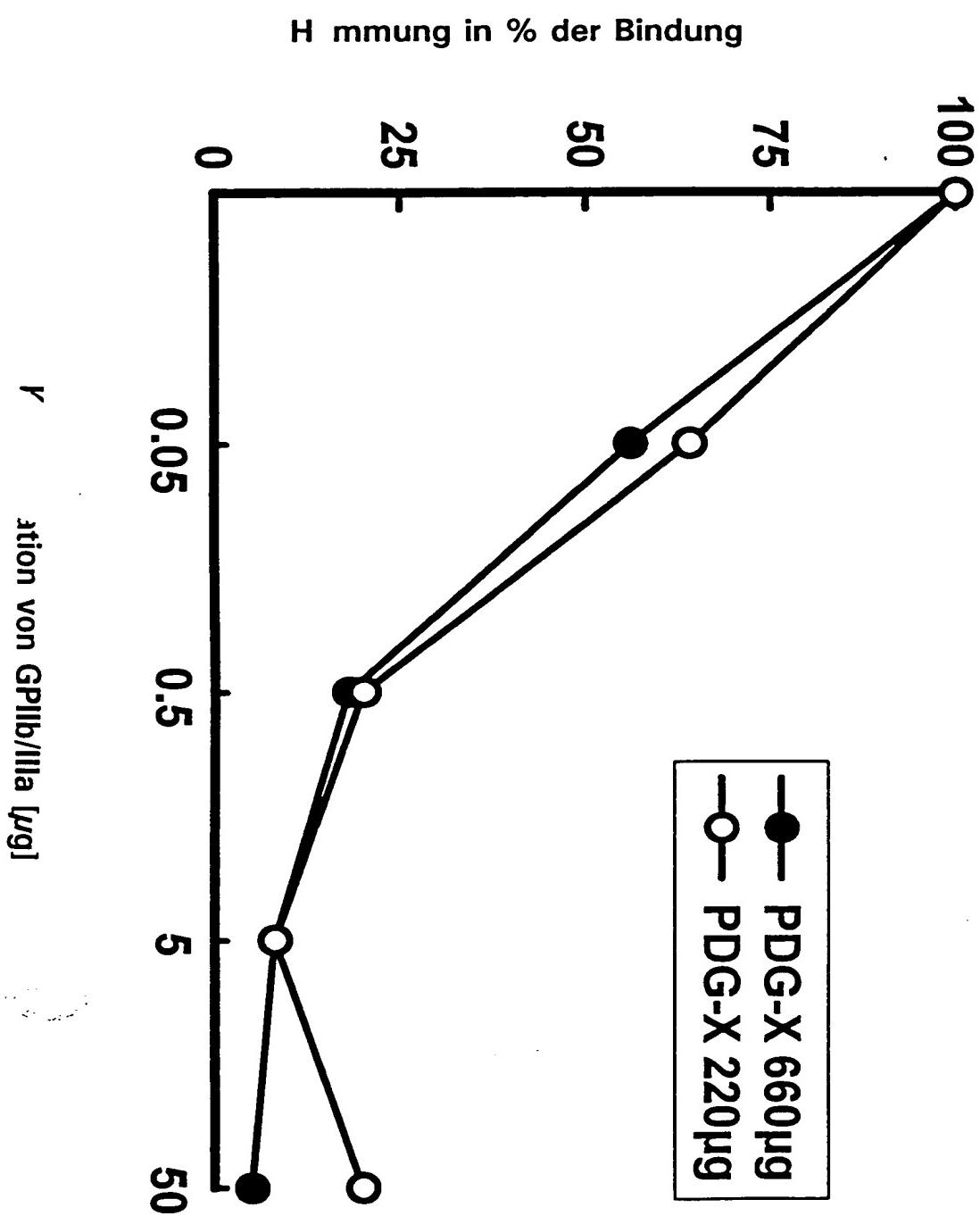
### **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die für humane  
5 Autoantikörper und antiidiotypische Antikörper gegen Blutplättchen-  
Membranproteine kodieren, neue Aminosäuresequenzen von humanen  
Antikörpern und deren Verwendung für die Diagnostik und Therapie von  
Krankheiten.

10

vo 11.12.97 12:53

Fig. 1



## SEQUENZPROTOKOLL

### (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

#### (i) ANMELDER:

- (A) NAME: ASAT AG Applied Science & Technology
- (B) STRASSE: Baarerstrasse 77
- (C) ORT: Zug
- (E) LAND: CH
- (F) POSTLEITZAHL: 6302

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Antikoerper

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 18

#### (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

### (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

#### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 357 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

#### (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..357

#### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GTG AAA CTG CTC GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	48
1 5 10 15	
ACC CTG TCC CTC AAC TGC ACT GTC TCT GGT CGC TCC ATC AGT GGT TAC Thr Leu Ser Leu Asn Cys Thr Val Ser Gly Arg Ser Ile Ser Gly Tyr	96
20 25 30	
TCT TGG AGA TGG ATC CGG CAG TCT CCA GGG AAG GGA CTA GAG TGG ATT Ser Trp Arg Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	144
35 40 45	
GGG GAT ATC TCT TAT AGT GGG AGT ACC AAG TAC AAA CCC TCC CTC AGG Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Lys Pro Ser Leu Arg	192
50 55 60	
AGT CGA GTC ACC CTG TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG Ser Arg Val Thr Leu Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu	240

65	70	75	80	
AAG CTG AAT TCG GTG ACC GCT GCG GAC ACG GCC GTC TAT TAC TGT GCG				
Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala				
85	90	95		
CGA GTC TTG CCC TTT GAC CCG ATC TCG ATG GAC GTC TGG GGC AAA GGG				
Arg Val Leu Pro Phe Asp Pro Ile Ser Met Asp Val Trp Gly Lys Gly				
100	105	110		
ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA				
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser				
115				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 119 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu				
1	5	10	15	
Thr Leu Ser Leu Asn Cys Thr Val Ser Gly Arg Ser Ile Ser Gly Tyr				
20	25	30		
Ser Trp Arg Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile				
35	40	45		
Gly Asp Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Lys Pro Ser Leu Arg				
50	55	60		
Arg Val Thr Leu Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu				
70	75	80		
Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala				
85	90	95		
Arg Val Leu Pro Phe Asp Pro Ile Ser Met Asp Val Trp Gly Lys Gly				
100	105	110		
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser				
115				

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 333 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: beides
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..333

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTG	GTG	ACT	CAG	CCA	CCC	TCA	GCG	TCT	GGG	ACC	CCC	GGG	CAG	TGG	GTC	48
Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Trp	Val	
120				125						130					135	
ACC	ATC	TCT	TGT	TCT	GGG	AGC	AGC	TCC	AAC	ATC	AGA	AGT	AAT	CCT	GTT	96
Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Ser	Asn	Pro	Val	
				140					145					150		
AGC	TGG	TAT	CAC	CAG	GTC	CCA	GGC	ACG	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TTT	144
Ter	Trp	Tyr	His	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	
				155				160						165		
AGT	CAT	CAG	CGG	CCC	TCA	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	192	
Ser	His	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser		
				170			175			180						
AAG	TCG	GGC	ACC	TCC	GCC	TCC	CTG	GCC	ATC	CGT	GGG	CTC	CAA	TCT	GGG	240
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Arg	Gly	Leu	Gln	Ser	Gly	
				185			190			195						
GAT	GCT	GGT	GAC	TAT	TAC	TGT	GCA	ACA	TGG	GAT	GAC	GGC	CTC	AAT	GGT	288
Asp	Ala	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Trp	Asp	Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	
				200			205			210					215	
CCG	GTG	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	AGT	CAG	CCC	333	
Pro	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Gln	Pro		
				220				225						230		

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 111 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Trp	Val	
1				5						10				15		
Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Ile	Arg	Ser	Asn	Pro	Val		
				20				25					30			
Ser	Trp	Tyr	His	Gln	Val	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	
				35				40					45			
Gly	Ser	His	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
				50				55					60			

Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Arg Gly Leu Gln Ser Gly  
65 70 75 80

Asp Ala Gly Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Gly Leu Asn Gly  
85 90 95

Pro Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Gln Pro  
100 105 110

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 369 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG	48
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
115 120 125	
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
130 135 140	
GCT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
145 150 155	
TTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG	192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
160 165 170 175	
AAG GGC CGA TTC GCC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT	240
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
180 185 190	
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
195 200 205	
GCG AGA GCG CTG GGG AGC TGG GGG GGT TGG GAC CAC TAC ATG GAC GTC	336
Ala Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gly Gly Trp Asp His Tyr Met Asp Val	
210 215 220	
TGG GGC AAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	369
Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
225 230	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 123 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein  
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

a Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ala Leu Gly Ser Trp Gly Gly Trp Asp His Tyr Met Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

1) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

  - (A) LÄNGE: 333 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: beides
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE:1..333

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTG	GTG	ACT	CAG	CCA	CCC	TCA	GCG	TCT	GGG	ACC	CCC	GGG	CAG	AGG	GTC
Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val
125						130					135				

ACC ATC TCT TGT TCT GGA AGC AGC TCC AAC ATC GGA AGT AAT ACT GTA

Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Thr	Val	
140					145					150					155	
AAC	TGG	TAC	CAG	CAG	CTC	CCA	GGA	ACG	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	144
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	
					160					165					170	
AGT	AAT	AAT	CAG	CGG	CCC	TCA	GGG	GTC	CCT	GAC	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	192
Ser	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
					175					180					185	
AAG	TCT	GGC	ACC	TCA	GCC	TCC	CTG	GCC	ATC	AGT	GGG	CTC	CAG	TCT	GAG	240
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu	
					190					195					200	
GAT	GAG	GCT	GAT	TAT	TAC	TGT	GCA	GCA	TGG	GAT	GAC	AGC	CTG	AAT	GGT	288
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Gly	
					205					210					215	
GTG	TTC	GGC	GGG	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC			333
Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro			
					225					230						

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 111 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Val	Val	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	
1				5						10				15		
Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	Thr	Val		
					20					25				30		
Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr		
					35					40				45		
Ser	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	
					50					55				60		
Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ser	Glu	
					65					70				75		80
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Asn	Gly	
					85					90					95	
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro		
						100				105					110	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LANGE: 369 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: beides
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 1..369

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LENGTH: 123 Aminosäuren
  - (B) PART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Phe  
                   20                        25                        30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                        40                        45

Ser Gly Ile Ser Gly Gly Leu Leu Thr His Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                        55                        60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ser Arg Asn Thr Val Tyr  
                   65                        70                        75                        80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                        90                        95

Val Arg Asp Leu Gly Tyr Arg Val Leu Ser Thr Phe Thr Phe Asp Ile  
                   100                        105                        110

Gly Gln Gly Thr Lys Val Thr Val Ser Ser  
                   115                        120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 375 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: beides
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMALE:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
  - (B) LAGE: 1..375

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GTG GTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA CAG TCG ATC	48
Val Val Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile	
125                                130                                135	
ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GCT ATT GGG AAT TAT AAC TTT	96
Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Ala Ile Gly Asn Tyr Asn Phe	
140                                145                                150                                155	
GTC CCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT	144
Val Pro Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile	
160                                165                                170	
TAT GAG GGC AGT AAG CGG CCC TCA GGG GTT TCT AAT CGC TTC TCT GGC	192
Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly	
175                                180                                185	
TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG ACA ATC TCT GGG CTC CAG GCT	240
Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala	

190	195	200	
GAG GAC GAG GCT GAG TAT TAC TGC TGC TCA TAT GTT CAT AGT AGC ACT			288
Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Val His Ser Ser Thr			
205	210	215	
AAT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC			336
Asn Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro			
220	225	230	235
AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT CTG TTC CCA CCC TCC TCT			375
Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser			
240	245		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 125 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Val	Val	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Ile
1															15
Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Ala	Ile	Gly	Asn	Tyr	Asn	Phe
															30
Val	Pro	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Met	Ile
															45
Tyr	Glu	Gly	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly
															60
Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Ala	
															80
Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Cys	Ser	Tyr	Val	His	Ser	Ser	Thr
															95
Asn	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	
															110
Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser			
															125

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 366 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: beides  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..366

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCA GGA CCA GGA CTG GTG AAG CCC TCG GAG Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu 130 135 140	48
ACC CTG TCT CTC ACC TGC ACT GTC TCT GAT GTC TCC ATC AGA AGT CAT Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Val Ser Ile Arg Ser His 145 150 155	96
TAC TGG AGT TGG CTC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT Tyr Trp Ser Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 160 165 170	144
TTT ATC TAT GAC GGT GCG AGA ACC AGG TTC AAC CCC TCC CTC AGG Phe Ile Tyr Asp Gly Ala Arg Thr Arg Phe Asn Pro Ser Leu Arg 175 180 185	192
AGT CGA GTC TCC CTT TCA ATG GAC CCA TCC AAG AAG CAG TTT TCC CTG Ser Arg Val Ser Leu Ser Met Asp Pro Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu 190 195 200 205	240
AAA CTG GGG TCT GTG ACC GCT GCG GAC TCG GCC GTC TAC TAC TGT GCG Lys Leu Gly Ser Val Thr Ala Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 210 215 220	288
AGA GAC GCG GAT GGA GAT GGC TTC AGC CCA TAC TAC TTT CCC TAC TGG Arg Asp Ala Asp Gly Asp Gly Phe Ser Pro Tyr Tyr Phe Pro Tyr Trp 225 230 235	336
~GC CAG GGA ATC CCG GTC TCC GTC TCC TCG Gln Gly Ile Pro Val Ser Val Ser Ser 240 245	366

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 122 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu 1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Val Ser Ile Arg Ser His 20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35	40	45
Gly Phe Ile Tyr Asp Gly Ala Arg Thr Arg Phe Asn Pro Ser Leu Arg		
50	55	60
Ser Arg Val Ser Leu Ser Met Asp Pro Ser Lys Lys Gln Phe Ser Leu		
65	70	75
Lys Leu Gly Ser Val Thr Ala Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85	90	95
Arg Asp Ala Asp Gly Asp Gly Phe Ser Pro Tyr Tyr Phe Pro Tyr Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Ile Pro Val Ser Val Ser Ser		
115	120	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 372 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: beides
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..372

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAC CCT GGG AGG	48		
Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val His Pro Gly Arg			
125	130	135	
CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT	96		
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
140	145	150	
ACT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG	144		
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
155	160	165	170
GCA CTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG	192		
Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
175	180	185	
AAG GGC CGA TTC GCC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTA TAT	240		
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
190	195	200	
CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT	288		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
205	210	215	

GCG AAA GAT GGC CGG AGT GGG AGC TAC GCC AGG TTC GAC GGT ATG GAC  
Ala Lys Asp Gly Arg Ser Gly Ser Tyr Ala Arg Phe Asp Gly Met Asp  
220 225 230

336

GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA  
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
235 240 245

372

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 124 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val His Pro Gly Arg  
5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Leu Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Lys Asp Gly Arg Ser Gly Ser Tyr Ala Arg Phe Asp Gly Met Asp  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 372 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: beides  
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 1..372

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

CAG GTG AAA CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg 125 130 135 140	48
TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr 145 150 155	96
GCC CTG CAC TGG GTC CGT CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC Ala Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 160 165 170	144
TCA GGT ATT AGT TGG GAT AGT GGT ACC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val 175 180 185	192
G GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr 190 195 200	240
CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys 205 210 215 220	288
GTA AAA GAT ATG GGG TCT TCG GTA GTG GCT ACG TAC AAT GCT TTT GAT Val Lys Asp Met Gly Ser Ser Val Val Ala Thr Tyr Asn Ala Phe Asp 225 230 235	336
ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser 240 245	372

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 124 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr 20 25 30
Ala Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Val Lys Asp Met Gly Ser Ser Val Val Ala Thr Tyr Asn Ala Phe Asp  
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

